บทที่ 3

วิธีทำการทดลอง (Experimental Procedure)

3.1 การเก็บสารตัวอย่าง

สารตัวอย่างคือ ผล และใบทุเรียน ที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ได้จากการเก็บในอำเภอต่างๆของจังหวัดนนทบุรี โดยเก็บผล และใบจากต้นทุเรียนที่มีอายุขนาดเดียวกันและเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว จำนวนทุเรียนต่างๆที่เก็บได้เพื่อใช้ในการศึกษามีประมาณ 20 ชนิด

3.2 วิธีวิเคราะห์หาปริมาณของน้ำและสารอื่นที่อาจจะระเหยได้ (Water and Volatile Substances Content)

ชั่งเนื้อทุเรียนให้ทราบน้ำหนักแน่นอน(ประมาณ 5 กรัม) ใส่ลงบนกระจกนาฬิกา แล้วนำไปอบในเตาอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซนติเกรด เป็นเวลา 10 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นใน desiccator แล้วนำไปชั่ง จากนั้นนำไปอบอีกครั้งหนึ่งจนได้น้ำหนักคงที่ น้ำหนักที่หายไปของเนื้อทุเรียนก็เป็นปริมาณของน้ำ และสารอื่นที่อาจจะระเหยได้ ณ อุณหภูมินี้

3.3 วิธีวิเคราะห์หาปริมาณของไขมัน (Fat Content)

ชั่งเนื้อทุเรียนที่อบแห้งและบดละเอียดแล้วให้ทราบน้ำหนักแน่นอน(ประมาณ 1 กรัม) ใส่ลงใน paper thimble แล้วนำไปสกัดด้วยอีเทอร์ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ Soxhlet apparatus เป็นเวลา 8–10 ชั่วโมง แล้วนำทุเรียนซึ่งถูกสกัดแล้วไปอบให้แห้งอีกครั้งหนึ่งเพื่อหาน้ำหนักของไขมันจากน้ำหนักที่ลดลงไป

3.4 วิธีวิเคราะห์หาปริมาณของโปรตีน (Protein Content)

3.4.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (Standard Solution)

ละลายแอมโมเนียมซัลเฟตหนัก 0.3000 กรัมในน้ำ แล้วทำให้เป็นสารละลายมีปริมาตรเป็น 1 ลิตร สารละลายที่ได้ใช้เป็นสารละลายมาตรฐานในการหาปริมาณของไนโตรเจน

3.4.2 การเตรียมสารละลายเนสเลอร์

สารละลาย(ก) ใช้เมอร์คิวริกไอโอไดด์ 10 กรัม และโปแตสเซียมไอโอไดด์ 7.0 กรัม ละลายในน้ำเย็นที่ปราศจากแอมโมเนีย 10 มิลลิลิตร

สารละลาย(ข) ใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 70 มิลลิลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

นำสารละลาย(ข)ผสมกับสารละลาย(ก)อย่างช้าๆ และคนตลอดเวลา หลังจากผสมเสร็จแล้ว เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร สารละลายนี้ควรจะให้สีกับสารละลายแอมโมเนียภายในเวลา 10 นาที และไม่ควรจะมีการตกตะกอนภายใน 2 ชั่วโมง

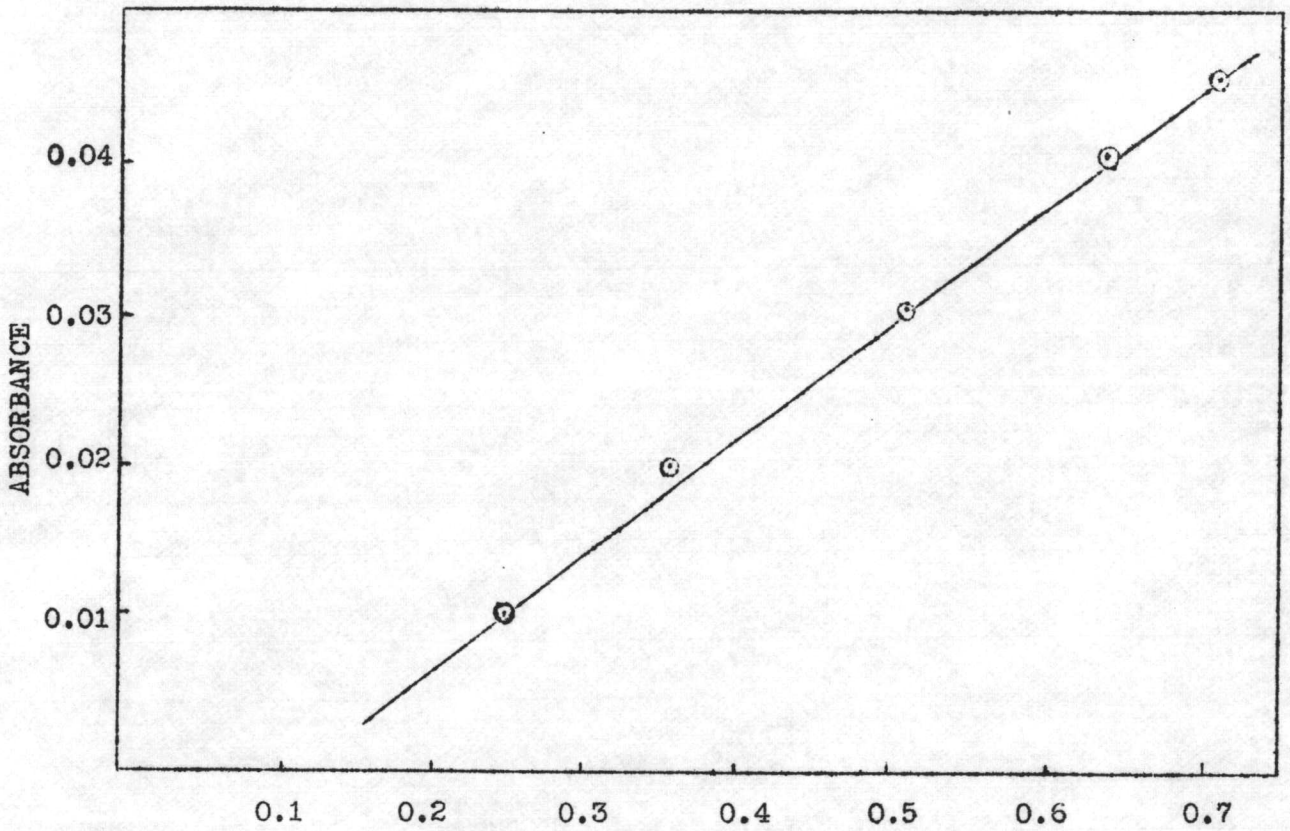
3.4.3 การทำกราฟมาตรฐาน (Calibration Curve)

ปิเปตสารละลายมาตรฐานของไนโตรเจนมา 0.10 , 0.15 , 0.20 , และ 0.30 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดมาตรฐานขนาด 25.0 มิลลิลิตร แล้วทำให้สารละลายเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนใกล้จะถึงขีด หยดสารละลายเนสเลอร์ 0.1 มิลลิลิตรลงในแต่ละขวด เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดพอดี เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลายเป็นสีเหลืองแกมน้ำตาล แล้วแบ่งสารละลายที่ได้ไปวัดค่า Absorbance ที่ความยาวคลื่น 500 nm และใช้ Slit กว้าง 0.25 nm โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ในการวัดค่า Absorbance ของสารละลาย ใช้น้ำกลั่นและสารละลายเนสเลอร์ปริมาณเท่ากับสารละลายมาตรฐานเป็นสารละลายเปรียบเทียบ (Blank) แล้วนำค่า Absorbance ที่ได้ไปเขียนกราฟแสดง

ความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของไนโตรเจน กราฟที่ได้เป็นกราฟมาตรฐานเพื่อใช้หาปริมาณของไนโตรเจนต่อไป ผลของการทดลองดังแสดงในตารางที่ 1 และรูปที่ 1

ปริมาณของไนโตรเจน(ppm)	Absorbance
0.250	0.010
0.356	0.020
0.510	0.030
0.635	0.040
0.712	0.045

ตารางที่ 1 แสดงค่า Absorbance กับความเข้มข้นของไนโตรเจน



รูปที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ของ ABSORBANCE กับปริมาณของไนโตรเจน (ppm)

3.4.4 การทำสารละลายที่จะใช้ย่อยโปรตีน (Digestion Mixture)

นำกรดซัลฟุริกมา 174 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นที่ต้มจนเดือด 160 มิลลิลิตรในขวดมาตรฐานขนาด 1 ลิตร แล้วเติมเมอร์คิวริกออกไซด์ลงไป 3.2 กรัม และโปแตสเซียม-ซัลเฟต 160 กรัม เขย่าขวดจนสารต่างๆละลายหมด แล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 1 ลิตร

3.4.5 วิธีหาปริมาณของโปรตีนที่ละลายน้ำได้ในทุเรียน

ชั่งเนื้อทุเรียนมาให้ทราบน้ำหนักแน่นอน(2-5 กรัม) นำไปสกัดด้วยน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร โดยใช้เบลนเดอร์ (Blender) ตีเป็นเวลานานพอสมควร แล้วทำให้เจือจางมีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันดีอีกครั้งหนึ่ง นำสารละลายที่ได้นี้ไปเซนตริฟิวจ์ แล้วนำสารละลายที่ใสๆมา 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายที่ใช้ย่อยโปรตีนลงไป 10 มิลลิลิตร ในขวด 100 มิลลิลิตร นำไปย่อยบนอ่างทรายที่ควบคุมอุณหภูมิได้ เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง จนได้สารละลายใส ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นจึงเติมน้ำกลั่นลงไปละลายผลึกที่ตกลงมาให้หมด แล้วทำให้สารละลายมีปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรในขวดมาตรฐาน นำสารละลายนี้มา 0.1 มิลลิลิตร แล้วทำให้สารละลายเจือจางจนเป็น 25 มิลลิลิตรในขวดมาตรฐาน หยดสารละลายเนสเลอร์ลงไป 0.1 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่า absorbance แบบเดียวกับ 3.4.2 ปริมาณของไนโตรเจนจะหาได้จากกราฟมาตรฐาน แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณของโปรตีนอีกครั้งหนึ่ง โดยคิดว่าโปรตีนประกอบด้วยไนโตรเจน 16 % (2)

3.5 วิธีหาปริมาณของคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate Content)

โดยที่ทราบน้ำหนักของน้ำ โปรตีน และไขมันแล้ว ปริมาณที่เหลืออยู่จากสารตัวอย่างคือปริมาณของคาร์โบไฮเดรต

3.6 วิธีหาปริมาณของธาตุต่างๆในทุเรียนโดยวิธี Atomic Absorption Spectrophotometry

3.6.1 การเตรียมสารตัวอย่าง

ชั่งสารตัวอย่างที่เป็นเนื้อ เม็ด เปลือก และใบของทุเรียนที่อบแห้งแล้วให้ทราบน้ำหนักแน่นอน(0.5 –5.0 กรัม) ใส่ลงในขวดแก้วขนาด 100มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร และกรดไนตริกเข้มข้น 10 มิลลิลิตร ต้มบนอ่างทรายที่ควบคุมอุณหภูมิได้ จนปริมาตรลดลงเหลือประมาณครึ่งหนึ่ง แล้วเติมกรดซัลฟุริกเข้มข้นลงไปอีก 5 มิลลิลิตร และกรดไนตริกเข้มข้นลงไปอีก ต้มจนได้สารละลายใส แล้วต้มต่อไปจนเกิดควันสีขาว ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมสารละลายแอมโมเนียมออกซาเลตที่อิ่มตัวลงไป 10 มิลลิลิตร ต้มต่อไปอีกครั้งจนเกิดควันสีขาว นำสารละลายที่ได้มาเติมน้ำจนสารละลายมีปริมาตรตามต้องการในขวดมาตรฐาน

3.6.2 การเตรียมสารละลายของธาตุต่างๆเพื่อใช้เป็นสารละลายมาตรฐาน

ชั่งสารเคมีให้ทราบน้ำหนักแน่นอน แล้วนำมาละลายด้วยน้ำกลั่นในขวดมาตรฐานขนาด 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐาน 100 ppm ของทองแดง เหล็ก แมงกานีส สังกะสี แคลเซียม แมกนีเซียม โซเดียมและโปแตสเซียม ตามลำดับ แล้วนำไปใส่ขวดโปลีเอทีลีนเพื่อป้องกันการเกิด adsorption บนขวดแก้ว

คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$)	0.03928	กรัม
แอมโมเนียมเฟอร์รัสซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4.FeSO_4.6H_2O$)	0.07021	"
แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2.4H_2O$)	0.03602	"
เลดไนเตรต ($Pb(NO_3)_2$)	0.01598	"
ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$)	0.04404	"
แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)	0.02495	"
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.10138	"

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.02542	กรัม
โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.01907	"

3.6.3 การทำกราฟมาตรฐาน (Calibration Curve)

ปิเปตสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิดจาก 3.6.2 มาจำนวนหนึ่ง(ตั้งแต่ 0.10–6.00 มิลลิลิตร) แล้วทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นในขวดมาตรฐานขนาด 50 มิลลิลิตร เพื่อจะเตรียมสารละลายมาตรฐานให้มีปริมาณธาตุเหล่านั้นจาก 0.20 ถึง 12.00 ppm สำหรับการเตรียมสารละลายมาตรฐานของธาตุแคลเซียม แมกนีเซียม โปแตสเซียม และโซเดียม จะต้องเติมสารละลายแลนทานัมคลอไรด์ที่มีแลนทานัมอยู่ 1500 ppm เพื่อกำจัด Anion effect (2) แล้วนำสารละลายแต่ละชนิดไปวัดค่า Absorbance โดยใช้เครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer โดยจัดเครื่องมือตามสภาวะดังแสดงในตารางที่ 2 ค่า absorbance ที่วัดได้ดังแสดงในตารางที่ 3 สำหรับกราฟมาตรฐานดังแสดงอยู่ในรูปที่ 2–6

ธาตุ	Wavelength(nm)	Lamp Current(mA)	Slit(μ)
ทองแดง	3246.0	3	100
เหล็ก	2481.0	5	50
แมงกานีส	2795.5	5	50
ตะกั่ว	2168.0	5	300
สังกะสี	2136.5	5	100
แคลเซียม	4224.0	3	100
แมกนีเซียม	2850.0	3	100
โซเดียม	5887.5	5	25
โปแตสเซียม	7662.5	5	300

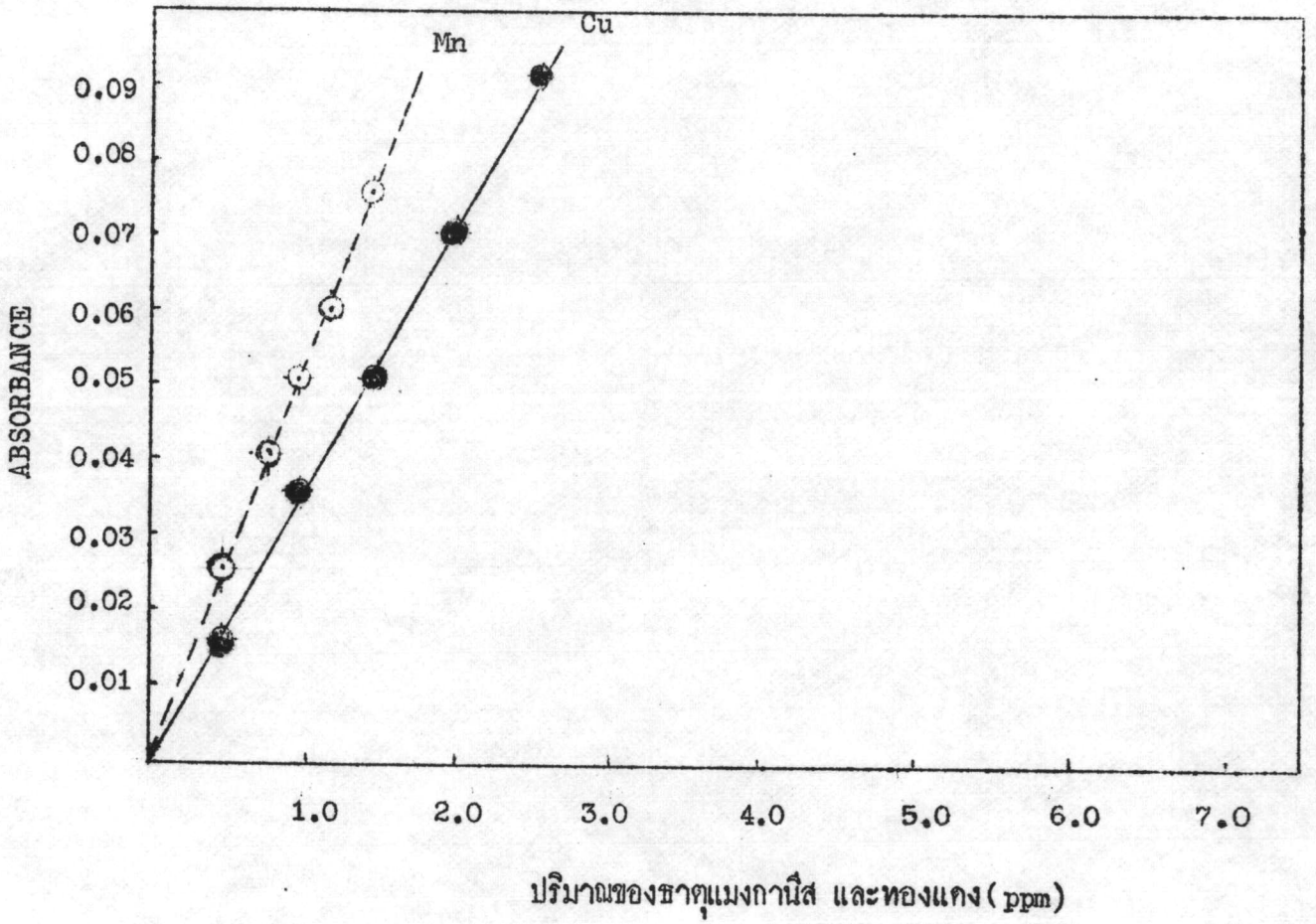
ตารางที่ 2 แสดงสภาวะการจัดเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer เพื่อใช้วัด absorbance

ตารางที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของ Ca , Fe , K , Mg ,Na ,Mn , และ Zn กับค่า absorbance ที่วัดได้

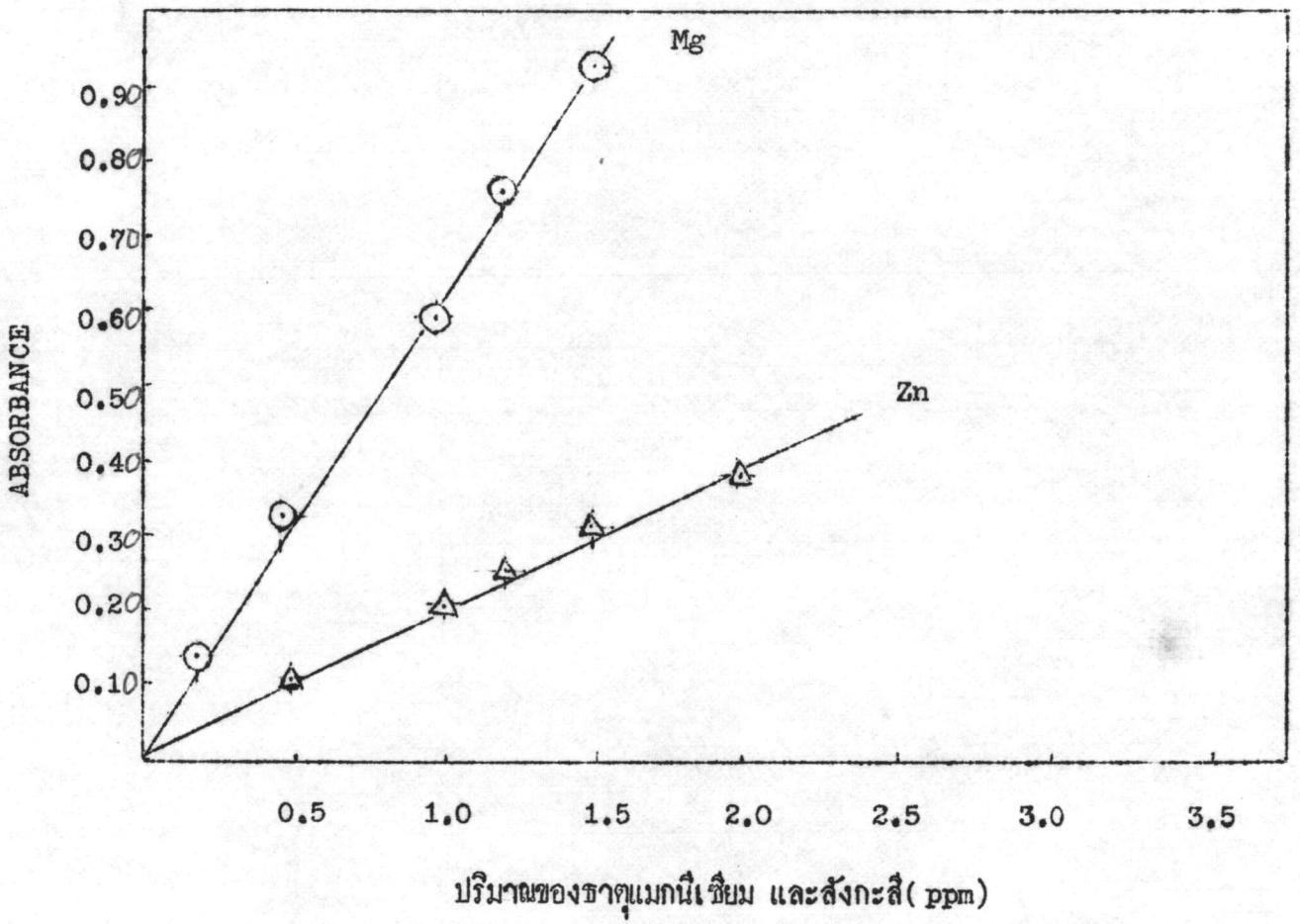
004397

ความเข้มข้นของธาตุ(ppm)	ค่า Absorbance ของธาตุ							
	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Na	Mn	Zn
0.2					0.135	0.075		
0.3	0.020					0.100		
0.4						0.125		
0.5	0.032	0.015	0.015	0.058	0.320	0.150	0.025	0.100
0.6						0.175		
0.7	0.045							
0.8						0.225	0.040	
0.9	0.058							
1.0		0.035	0.030	0.095	0.585		0.050	0.200
1.2					0.755		0.060	0.250
1.5		0.050	0.040		0.915		0.075	0.300
2.0		0.070	0.055	0.018				0.380
2.5		0.090						
3.0			0.090	0.285				
4.0			0.115	0.375				
5.0				0.475				
6.0			0.175	0.560				
8.0			0.225	0.735				
10.0			0.275					
12.0			0.330					

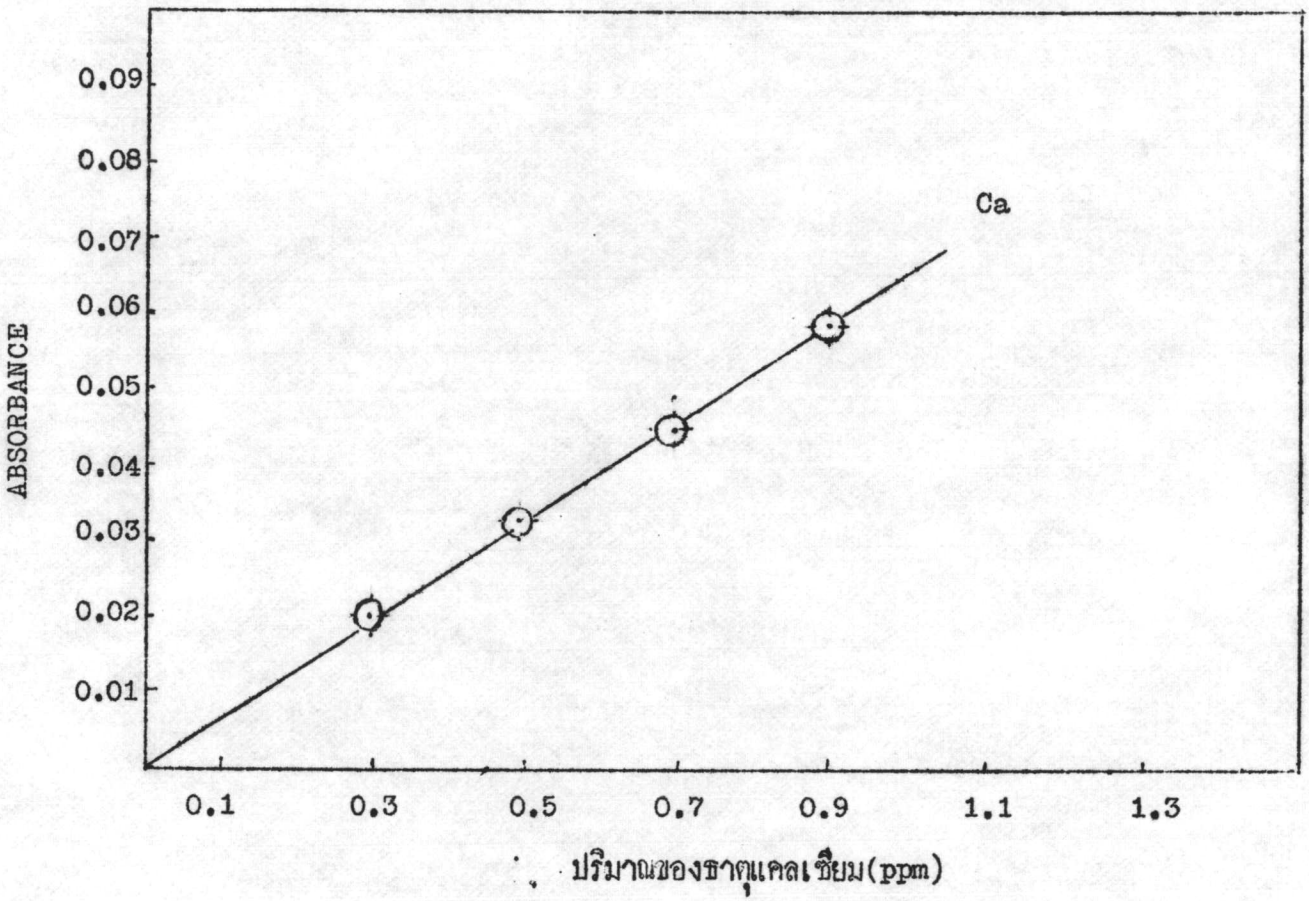
i 17169525



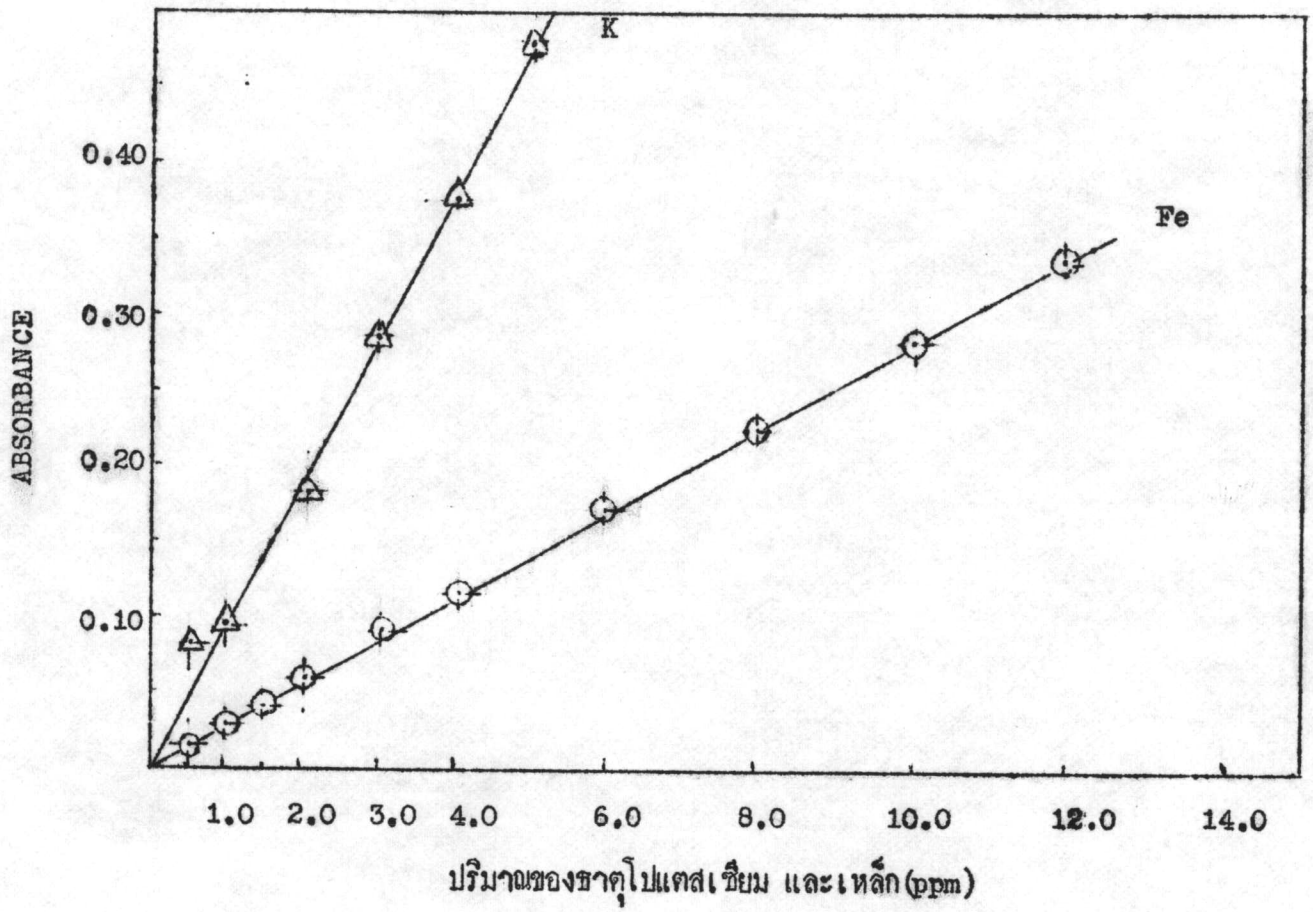
รูปที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ของ ABSORBANCE กับปริมาณของธาตุแมงกานีส และทองแดง (ppm)



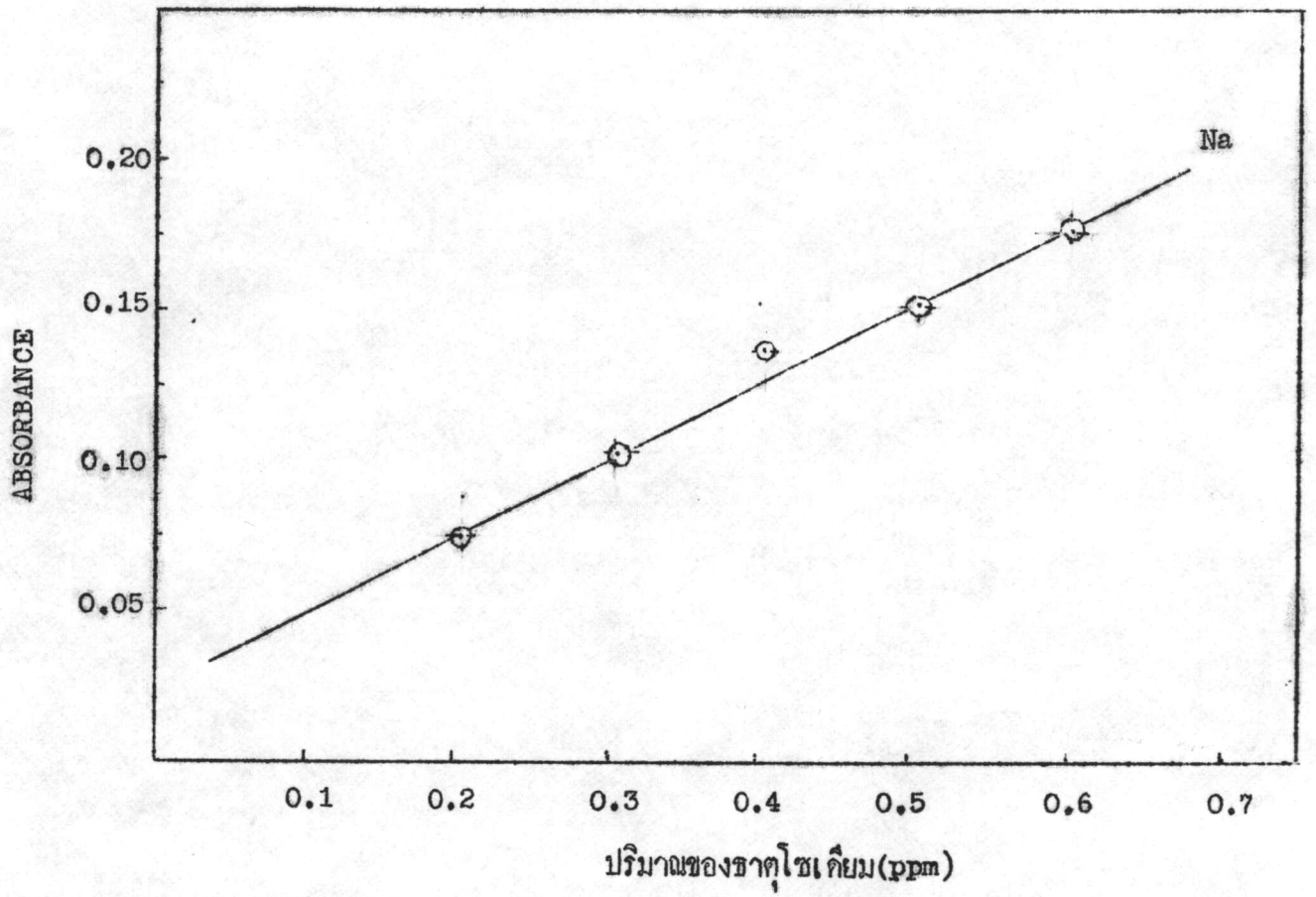
รูปที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ของ ABSORBANCE กับปริมาณของธาตุแมกนีเซียม และสังกะสี (ppm)



รูปที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ของ ABSORBANCE กับปริมาณของธาตุแคลเซียม(ppm)



รูปที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ของ ABSORBANCE กับปริมาณของธาตุโปแตสเซียม และเหล็ก(ppm)



รูปที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ของ ABSORBANCE กับปริมาณของธาตุโซเดียม(ppm)

3.6.4 วิธีหาปริมาณของทองแดง เหล็ก แมงกานีส และสังกะสี ในสารตัวอย่าง

นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้จากเม็ด เปลือก และใบ จาก 3.6.1 มาทั้งหมด แล้วทำให้เจือจางลงด้วยน้ำกลั่น ในขวดมาตรฐานจนมีปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ส่วนสารละลายตัวอย่างที่ได้จากเนื้อทุเรียน นำมาทั้งหมดแล้วทำให้เจือจางลงด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่า absorbance ด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer จากค่า absorbance ที่วัดได้ของแต่ละธาตุ นำไปหาปริมาณของธาตุนั้นๆจากกราฟมาตรฐานอีกครั้งหนึ่ง ผลของการทดลองดังแสดงในตารางที่ 6

3.6.5 การหาปริมาณของแคลเซียม โปแตสเซียม แมกนีเซียม และโซเดียม

นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้จากเม็ด เปลือก และใบมา 0.5 มิลลิลิตร แล้วทำให้เจือจางลงด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร สำหรับสารละลายที่ได้จากเนื้อทุเรียนนำมา 0.1 มิลลิลิตร เติมสารละลายแลนทานัมคลอไรด์ที่มีปริมาณแลนทานัม 1500ppm แล้วทำสารละลายให้เจือจางลงด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่า absorbance แล้วนำไปหาปริมาณของธาตุนั้นๆจากกราฟมาตรฐาน ผลของการทดลองดังแสดงในตารางที่ 5

3.7 วิธีหาปริมาณของกำมะถันโดยใช้วิธีตกตะกอน(Gravimetric Method)

ชั่งสารตัวอย่างแต่ละชนิดที่อบแห้งแล้วมาให้ทราบน้ำหนักแน่นอน(0.5 กรัม) นำไปหลอมกับโซเดียมเปอร์ออกไซด์ใน Platinum Crucible เป็นเวลาครึ่งชั่วโมง แล้วละลายด้วยน้ำกลั่นประมาณ 3 มิลลิลิตร ทำสารละลายที่ได้ให้เป็นกรดด้วย 0.1 โมล่าร์ กรดไฮโดรคลอริก จนไม่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เกิดขึ้นอีก แล้วจึงเติมสารละลายแบเรียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 โมล่าร์ให้มากเกินพอ คนให้ดีและทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที แล้วกรองเอาตะกอนออก โดยใช้กระดาษกรอง Whatman#540 นำตะกอนที่ได้ไปเผาใน

porcelain crucible ที่รู้น้ำหนักแน่นอนแล้ว จนกลายเป็นสีขาว น้ำหนักของ porcelain crucible ที่เพิ่มขึ้นจะเป็นน้ำหนักของแบเรียมซัลเฟต แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณของกำมะถันได้ ผลของการทดลองดังแสดงในตารางที่ 5

3.8 วิธีการหาปริมาณของสารหนูโดยวิธีอาบรังสีด้วยนิวตรอน (Neutron Activation Analysis)

เนื่องจากวิธีหาปริมาณของธาตุบางชนิดนั้น neutron activation analysis สามารถทำได้ดีทั้งคุณภาพและปริมาณวิเคราะห์ โดยเฉพาะธาตุที่มีอยู่น้อยๆ โดยอาศัยวิธีทำให้ธาตุที่ต้องการหาปริมาณกลายเป็นสารกัมมันตภาพรังสี จากปริมาณรังสีที่วัดได้เมื่อเทียบกับปริมาณรังสีของสารมาตรฐานก็จะหาปริมาณของธาตุที่ต้องการได้

3.8.1 การเตรียมสารตัวอย่าง

ชั่งสารตัวอย่างที่อบแห้งแล้วให้ทราบน้ำหนักแน่นอน(0.2-0.4 กรัม) ใส่ลงในขวดโปลีเอทีลีนเล็กๆ (Polyethylene vial) แล้วปิดขวดและเชื่อมให้สนิทด้วยความร้อนเพื่อป้องกันการรั่วไหล

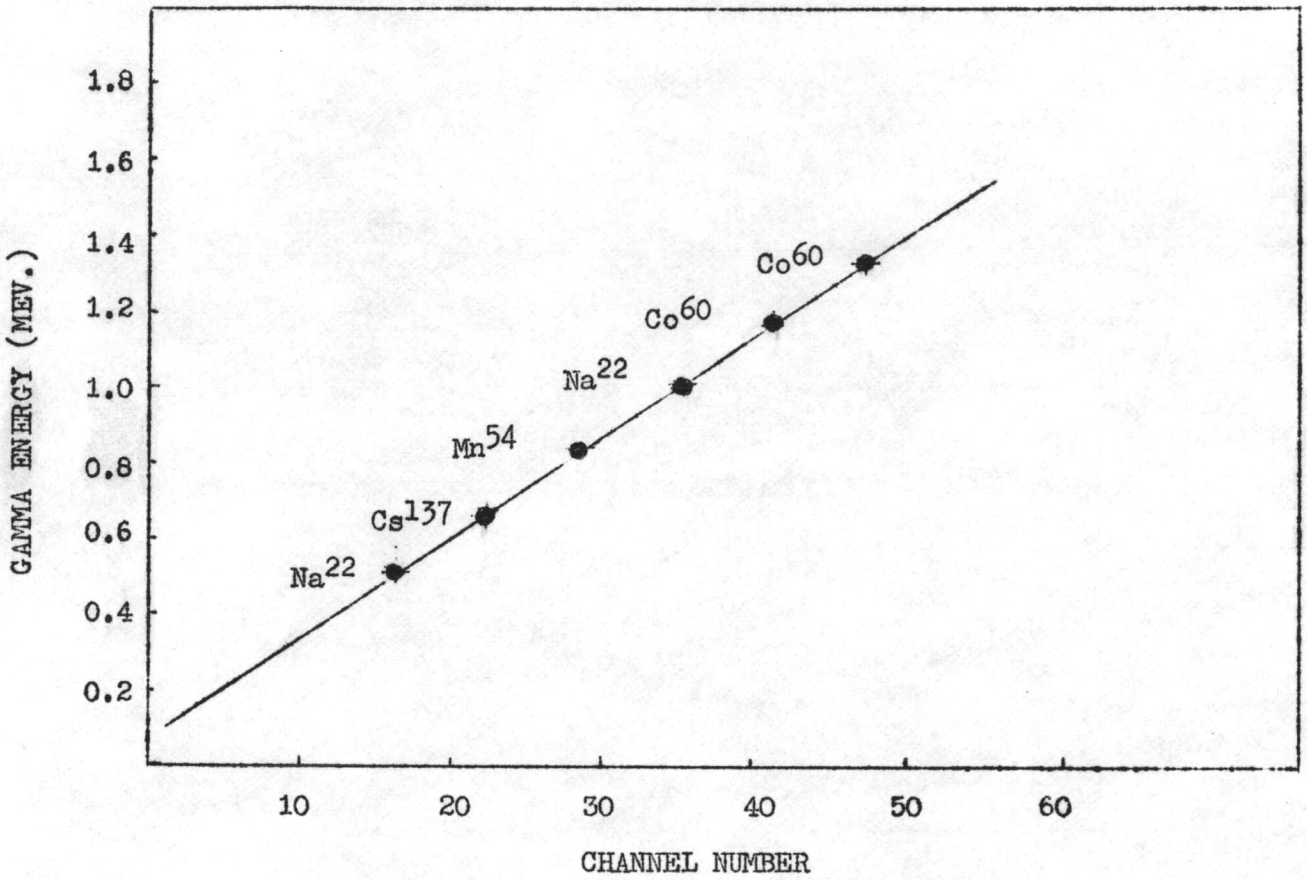
3.8.2 การเตรียมสารหนูมาตรฐาน (Standard Arsenic)

ชั่งอาร์เซเนียสออกไซด์ชนิด Spectrochemical grade ให้ทราบน้ำหนักแน่นอน แล้วทำให้เป็นสารละลายในขวดมาตรฐาน จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายตามที่ต้องการ (10-20 ppm)มาใส่ในขวดโปลีเอทีลีน แล้วนำไปทำให้แห้งโดยใช้ infrared lamp เมื่อแห้งดีแล้วจึงปิดจุกและเชื่อมให้สนิทด้วยความร้อนเพื่อป้องกันการรั่วไหล

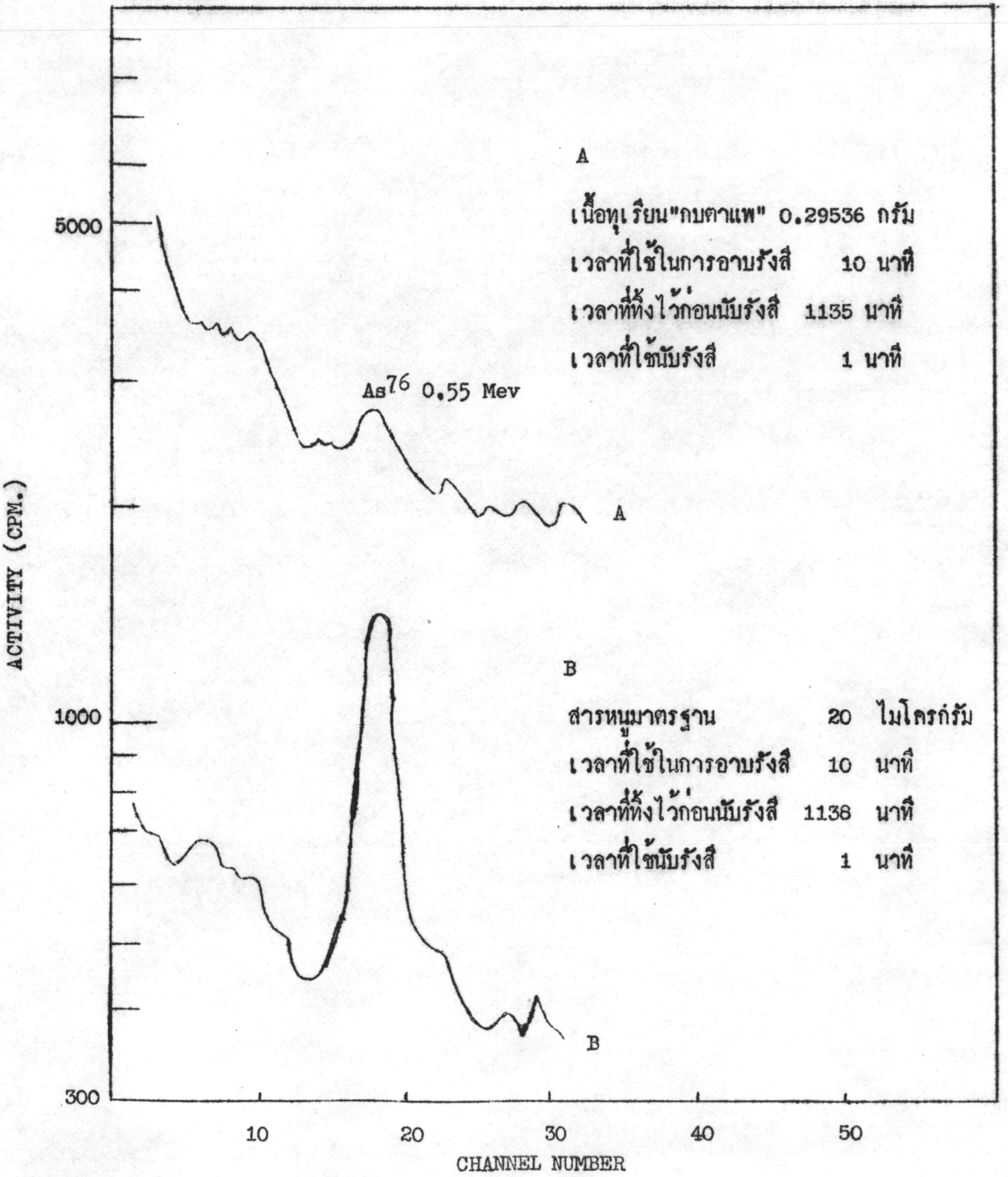
3.8.3 การอาบรังสี (Irradiation) และการวัดรังสี

นำสารตัวอย่างและสารหนูมาตรฐานไปอาบรังสีด้วยเทอร์มอลนิวตรอน (Thermal neutron) พร้อมกันเป็นเวลา 10 นาทีในเครื่องปฏิกรณ์ปรมาณู สารหนูจะกลายเป็นสารหนูกัมมันตภาพรังสี (radioactive arsenic) ด้วยปฏิกริยานิวเคลียร์ As^{75} (n,γ) As^{76} ; $\therefore$ As^{76} จะให้รังสีแกมมาซึ่งมีพลังงาน 0.55 MeV ซึ่งสามารถตรวจสอบได้จากกราฟมาตรฐาน ตามรูปที่ 7 และมีครึ่งชีวิต (Half-life) 26.5 ชั่วโมง

การวัดปริมาณของรังสีแกมมาที่ได้จาก As^{76} โดยนำสารตัวอย่างและสารหนูมาตรฐานที่ได้จากการอาบรังสีมาใหม่ๆ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 ชั่วโมง เพื่อลดปริมาณของรังสีให้พอที่จะวัดได้ และเพื่อให้ธาตุที่มีกัมมันตภาพรังสีที่มีครึ่งชีวิตสั้นๆสลายตัวไปเสียก่อน เช่น ธาตุ Mn^{56} ($t_{\frac{1}{2}}$ 2.58 ชั่วโมง) แล้วจึงนำไปวัดปริมาณของรังสีโดยใช้เครื่องแกมมาสเปคโตรมิเตอร์ (Gamma Spectrometer)



รูปที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ENERGY ของ GAMMA
กับ CHANNEL NUMBER



รูปที่ 8 แสดงลักษณะของ GAMMA SPECTRA ของเนื้อทุเรียน (A)
และของสารหนูมาตรฐาน (B)